

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-156320

(43)Date of publication of application : 19.06.1989

(51)Int.Cl.

C08G 63/06
C12P 7/62
C12P 9/00
// (C12P 7/62
C12R 1:05)
(C12P 9/00
C12R 1:05)

(21)Application number : 62-316446

(71)Applicant : MITSUBISHI KASEI CORP

(22)Date of filing : 15.12.1987

(72)Inventor : DOI YOSHIHARU

(54) POLYESTER COPOLYMER AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce the title copolymer advantageously and easily by multiplying an alcaligenes which can produce poly-3-hydroxybutyrate, and then cultivating it in the presence of two specific compounds.

CONSTITUTION: An alcaligenes which can produce poly-3-hydroxybutyrate (e.g., *Alcaligenes faecalis* ATCC8750) is inoculated in an ordinary medium containing sources of carbon and nitrogen, inorganic components, etc., and is cultivated aerobically at a pH of 6W10 and a temperature of 20W40° C to multiply the fungus. Then, the cells are cultivated in a culture broth which is free from N₂ and P and contains a compound of formula I (wherein X is H, halogen, or hydroxy; Y is alkyl; n is 1W4; and Z is H or a monovalentWtetraivalent metal element) and a compound of formula II (wherein M is hydroxy or halogen; and N is Z) in an amount of 3W40g/l to produce a polyester copolymer comprising 10W90mol.% 3-hydroxybutyrate unit, 3W60mol.% 4-hydroxybutyrate unit, and 5W87mol.% 3-hydroxyvalerate unit and having an intrinsic viscosity of 0.4W10.0dl/g (30° C, in chloroform).



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

BEST AVAILABLE COPY

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A) 平1-156320

⑤ Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 平成1年(1989)6月19日
C 08 G 63/06	NLP	6904-4J	
C 12 P 7/62		7236-4B	
		7236-4B	
//(C 12 P 7/62			
(C 12 R 1:05)			
(C 12 P 9/00			
C 12 R 1:05)			
	6712-4B	審査請求 未請求	発明の数 2 (全8頁)

⑭ 発明の名称 ポリエステル共重合体およびその製造方法

⑮ 特 願 昭62-316446

⑯ 出 願 昭62(1987)12月15日

⑰ 発 明 者 土 肥 義 治 神奈川県横浜市旭区今宿町2617-39

⑱ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

⑲ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

明 細 書

1 発明の名称

ポリエステル共重合体およびその製造方法

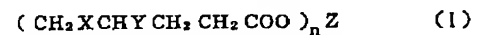
2 特許請求の範囲

- (1) γ-ヒドロキシブチレート単位 10~90モル%
- ε-ヒドロキシブチレート単位 3~60モル%
- γ-ヒドロキシバレート単位 5~87モル%
- からなり、30℃クロロホルム中で測定した[η]が0.4~1.0 dl/gの範囲にあるポリエステル共重合体。

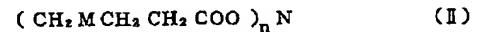
- (2) ポリ-γ-ヒドロキシブチレート生産能を有するアルカリゲネス菌を前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素あるいはリンの制限下で培養して該菌体内にポリ-γ-ヒドロキシブチレートを生成、蓄積させるに際して後段の培養を

- (i) 下記一般式(I)で表わされる化合物 および
- (ii) 下記一般式(II)で表わされる化合物 の存在下に起こることを特徴とするγ-ヒドロキシブチレート単位、ε-ヒドロキシブチレ-

ト単位およびγ-ヒドロキシバレート単位からなるポリエステル共重合体の製造方法。



(但し式中Xは、水素原子、ハロゲン原子もしくはヒドロキシ基、Yは水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基もしくはアルキル基、nは1~4の整数、Zは水素原子または1~4価の金属原子を示す)



(但し式中Mは、ヒドロキシル基またはハロゲン原子を、nは1~4の整数、Nは水素原子または1~4価の金属原子を示す)

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はγ-ヒドロキシブチレート単位(以下γHB成分と記す)、ε-ヒドロキシブチレ-

ート単位（以下 4 H B 成分と記す）、および 3-ヒドロキシバチレート単位（以下 3 H V 成分と記す）を含有する共重合体およびその製造法に関し、更に詳しくは、ポリエステルを蓄積できる微生物を用いて製造される 3 H B 成分、4 H B 成分および 3 H V 成分からなる新規の共重合ポリエステル及びその製造方法に関する。

（従来の技術）

ポリ-3-ヒドロキシバチレート（P H B）は、エネルギー貯蔵物質として数多くの微生物の菌体内に蓄積され、優れた生物分解性と生体適合性を示す熱可塑性高分子であることから、環境を保全する“クリーン”プラスチックとして注目され、手術糸や骨折固定用材などの医用材料および医薬や農薬を徐々に放出する徐放性システムなどの多方面への応用が長年にわたり期待されてきた。特に近年、合成プラスチックが環境汚染や資源循環の観点から深刻な社会問題となるに至り、P H B は石油に依存しないバイオポリマーとして注目されている。

- 3 -

しながら、この公報においては、たとえば、実施例では最高 33 モル % の 3 H V 成分を含む共重合体しか示されておらず、3 H V 成分がこれよりも多い共重合体は具体的には示されていない。

一方、後者では、後段の培養において、P H B 抽出後の菌体の細胞物質からの炭素を使用し、少なくとも 40 モル % の 3 H B 成分と他のエステル成分とを含む共重合体を製造するとの定性的な記載がある。しかしながら、この公報には、3 H B 成分と 3 H V 成分との割合を具体的に示した共重合体は全く記載されていない。また、この方法は煩雑であり、かつ、細胞物質の成分は、培養条件などにより物質の種類、量などに大幅の変動があり不安定であって、実際的ではない。

さらに、共重合体の 3 H V 成分が 0 から 33 モル % まで増大すると、この増大に伴って融解温度（ T_m ）が 180℃ から 85℃ まで急激に低下することが知られており（T. L. Bluhm et

（発明が解決しようとする問題点）

しかしながら、P H B は耐衝撃性に劣るといふ物性上の問題とともに、生産コストが高いことから工業的生産が見送られてきた。

近時、3 H B 成分および 3 H V 成分を含有する共重合体およびその製造法について、研究、開発がなされ、たとえば、特開昭 57-150393 号公報および特開昭 59-220192 号公報にそれぞれ記載されている。

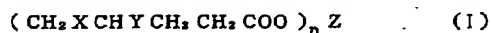
これらの公報の P H B の製造法は、従来の P H B の製造法におけると同様に、前段では菌体を増殖させ、後段では窒素またはリンを制限して微生物を培養し、共重合体を製造するものである。

しかしながら、前者では、後段の培養において基質として、たとえば、プロピオン酸およびイソ酪酸を使用することにより、3 H B 成分 99.9 ~ 50 モル % と、たとえば、3 H V 成分のような他のエステル成分 0.1 ~ 50 モル % を含む共重合体を製造するとの記載がある。しか

- 4 -

al, *Macromolecules*, 19, 2871-2876 (1986))、このことは、工業的には均一な製品を得ることが困難であることを意味している。〔問題点を解決するための手段〕

本発明者は、3 H B 成分に対する共重合成分、即ち 4 H B、及び 3 H V 成分の割合（モル比）が比較的大きい共重合体を工業的に有利にかつ容易に製造すべく鋭意検討した結果、後段の窒素もしくはリンを制限する培養において
(イ) 下記一般式 (I) で表わされる化合物 および
(ロ) 下記一般式 (II) で表わされる化合物の存在下で P H B 生産能を有する微生物を培養すると、この菌体中に 3 H B 成分に対する 4 H B 成分および 3 H V 成分の割合（モル比）が比較的大きい共重合体が生成蓄積されたとの新知見を得て本発明に到達した。

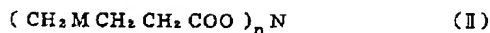


（式中 X は水素原子、ハロゲン原子もしくはヒドロキシ基、Y は水素原子、ハロゲン原子、ヒ

- 5 -

- 6 -

ドロキシ基もしくはアルキル基、 n は1~4の整数、 Z は水素原子または1~4価の金属原子を示す。)

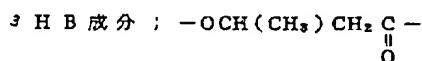


(式中Mはヒドロキシ基またはハロゲン原子を、 n は1~4の整数、 N は水素原子または1~4価の金属原子を示す。)

すなわち本発明は3HB:10~90モル%、4HB:3~60モル%、3HV:5~87モル%から成る(η)が0.4~10.0dl/gの範囲にあるポリエステル共重合体、及びその製造方法に存する。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明において共重合体に含有される3HB成分、4HB成分および3HV成分はそれぞれ次式であらわされる。

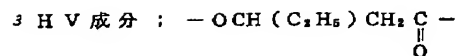
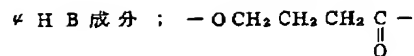


- 7 -

ATCC 17699およびこのH-16株の突然変異株であるアルカリゲネス ユウトロフス NCIB 11597, 同NCIB 11598, 同NCIB 11599, 同NCIB 11600などを挙げるができる。これらのうち、実用上、アルカリゲネス ユウトロフスH-16 ATCC 17699およびアルカリゲネス ユウトロフス NCIB 11599が特に好ましい。

アルカリゲネス属に属するこれらの微生物の菌学的性質は、たとえば、"BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY: Eighth Edition, The Williams & Wilkins Company/Baltimore"に、また、アルカリゲネス ユウトロフスH-16の菌学的性質は、たとえば、"J. Gen. Microbiol., 113, 185~192 (1979)"にそれぞれ記載されている。

これらの微生物は、従来の方法と同様に、主として菌体を増殖させる前段の培養と、窒素もしくはりんを制限して菌体内に共重合体を生成、



本発明で使用される微生物は、PHB生産能を有する微生物であれば特に制限はないが、実用上は、たとえば、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*)、アルカリゲネス ルーランディイ (*Alcaligenes ruhlandii*)、アルカリゲネス ラタス (*Alcaligenes latus*)、アルカリゲネス アクアマリヌス (*Alcaligenes aquamarinus*) およびアルカリゲネス ユウトロフス (*Alcaligenes eutrophs*) 等のアルカリゲネス属などがある。

これらの菌種に属する菌株の代表例として、アルカリゲネス フェカリス ATCC 8750, アルカリゲネス ルーランディイ ATCC 15749, アルカリゲネス ラタス ATCC 29712, アルカリゲネス アクアマリヌス ATCC 14400 ならびにアルカリゲネス ユウトロフス H-16

- 8 -

蓄積させる後段の培養との2段で培養される。

前段の培養は、微生物を増殖させる為の通常の培養法を運用することができる。すなわち、使用する微生物が増殖し得る培地および培養条件を採用すればよい。

培地成分は、使用する微生物が資化し得る物質であれば特に制限はないが、実用上は、炭素源としては、たとえば、メタノール、エタノールおよび酢酸などの合成炭素源、二酸化炭素などの無機炭素源、酵母エキス、糖蜜、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物、アラビノース、グルコース、マンノース、フラクトースおよびガラクトースなどの糖類ならびにソルビトール、マンニトールおよびイノシトールなど、窒素源としては、たとえば、アンモニア、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および/または、たとえば、尿素、コーン・スティープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物ならびに無機成分としては、たとえば、カルシウム塩、マグネシ

ウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、りん酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩、ニッケル塩、クロム塩、ほう素化合物およびよう素化合物などからそれぞれ選択される。

また、必要に応じて、ビタミン類なども使用することができる。

培養条件としては、温度は、たとえば、20〜40℃程度、好ましくは25〜35℃程度とされ、また、pHは、たとえば、6〜10程度、好ましくは6.5〜9.5程度とされる。このような条件で好氣的に培養する。

これらの条件をはずして培養した場合には、微生物の増殖は比較的悪くなるが、これらの条件をはずして培養することを妨げない。

培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

前段の培養によって得られた菌体を、さらに窒素および／またはりん制限条件下で培養する。すなわち、前段の培養で得られた培養液から

微生物の菌体を、濾過および遠心分離のような通常の固液分離手段により分離回収し、この菌体を後段の培養に付するか、または、前段の培養において、窒素および／またはりんを実質的に枯渇させて、菌体を分離回収することなく、この培養液を後段の培養に移行させることによってもできる。

この後段の培養においては培地または培養液に窒素および／またはりんを実質的に含有させず

(i) 前記一般式(I)で表わされる化合物 および
(ii) 前記一般式(II)で表わされる化合物を炭素源として含有させること以外は前段の培養と異なるところはない。

本発明で使用する一般式(I)で表わされる化合物としては具体的には、吉草酸、4-クロロ吉草酸、4-ヒドロキシ吉草酸、4-メチル吉草酸、4-エチル吉草酸、5-ヒドロキシ吉草酸、5-クロロ吉草酸等およびそれぞれのナトリウム塩およびカリウム塩などが挙げられる。

-11-

本発明で使用する前記一般式(II)で表わされる化合物としては具体的には、4-ヒドロキシ酪酸、4-クロロ酪酸、4-ブromo酪酸等の酪酸誘導体およびそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等が挙げられる。

本発明を実施するにあたり前記一般式(I)および一般式(II)で表わされる化合物は、後段の培養における培地もしくは培養液に含有せしめる。後者の場合には、培養の初期ないし後期のどの時点でもよいが、培養の初期が好ましい。

本発明に用いられる前記一般式(I)および一般式(II)で表わされる化合物は、共重合体を生成させることができ、かつ微生物の生育を阻害しないような量であればよく使用した微生物の菌体および所望の共重合割合(モル比)などによって異なるが、一般的には培地もしくは培養液1Lに前記一般式(I)および一般式(II)の合計が3〜40g程度が適当である。

この後段の培養においては前記一般式(I)および一般式(II)で表わされる化合物を唯一の炭

-12-

素源としてもよいが、使用した微生物が酸化し得る他の炭素源、たとえば、グルコース、フラクトース、メタノール、エタノール、酢酸、プロピオン酸、ユ-酪酸、乳酸および吉草酸などを共存させることもできる。たとえば、グルコースを使用する場合には、多くても1.5g/L程度とされる。

このように培養して得られた培養液から、濾過および遠心分離などの通常の固液分離手段によって菌体を分離回収し、この菌体を洗浄、乾燥して乾燥菌体を得、この乾燥菌体から、常法により、たとえば、クロロホルムのような有機溶剤で生成された共重合体を抽出し、この抽出液に、たとえば、ヘキサンのような貧溶媒を加えて、共重合体を沈殿させる。

本発明の製造法によれば、共重合体中の3HB成分、4HB成分、3HV成分の割合は任意に調節することができる。各成分の割合は3HB:10〜90モル%、4HB:3〜60モル%、3HV:5〜87モル%の範囲ならいずれ

-13-

-168-

-14-

も選択し得るが、例えば 3HB:10~80モル%、4HB:3~50モル%、3HV:10~70モル%が選ばれる。

〔実施例〕

本発明を、実施例によりさらに具体的に説明する。なお、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例1~4及び比較例1~2

アルカリゲネス ユウトロフス NCIB 11599 を使用して共重合体を製造した。すなわち、

前段培養：

つぎの組成を有する培地で前記の微生物を 30℃で24時間培養し、対数増殖期終期の培養液から遠心分離により菌体を分離した。

前段培養用培地の組成

酵母エキス 10g ポリペプトン 10g
肉エキス 5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g
これらを脱イオン水1ℓに溶解し、pH 7.0に調整した。

-15-

CaSO_4 156.4mg

を0.1N-HCl 1ℓに溶解

これらを脱イオン水1ℓに溶解し、pH 7.0に調整した。

菌体の処理：

後段培養で得られた菌体を蒸留水で洗浄し、引続きアセトンで洗浄し、これを減圧乾燥(20℃、0.1mmHg)して乾燥菌体を得た。

共重合体の分離回収：

このようにして得られた乾燥菌体から熱クロロホルムで共重合体を抽出し、この抽出液にヘキサンを加えて共重合体を沈澱させ、この沈澱を濾取、乾燥して共重合体を得た。

共重合体の特性：

このようにして得られた共重合体の組成、固有粘度、融解温度および融解熱を、つぎのようにして測定した。すなわち、

組 成 : ^1H -NMRスペクトルによる。

固有粘度(η) : 30℃、クロロホルム中。

融解温度 T_m : DSC測定による。

-17-

後段培養：

前段培養で得られた菌体を、つぎの組成を有する培地に、1ℓあたり5gの割合で懸濁させ30℃で48時間培養し、得られた培養液から遠心分離により菌体を分離して、菌体を得た。

後段培養用培地の組成

0.5M リン酸水素カリウム水溶液 39.0ml

0.5M リン酸水素二カリウム水溶液 53.6ml

20wt/V% 硫酸マグネシウム水溶液 1.0ml

炭素源*

ミネラル溶液** 1.0ml

* 炭素源として表1に記した様に4-ヒドロキシ酪酸および吉草酸を用いた。(単位g/ℓ培地)

** ミネラル溶液

CoCl_2 119.0mg

FeCl_3 9.7g

CaCl_2 7.8g

NiCl_2 118.0mg

CrCl_3 62.2mg

-16-

(昇温速度 10℃/分)

融 解 熱 ΔH : DSC測定による。

測定結果などを第1表に示す。

尚、実施例1で得られた共重合体の500MHz

^1H -NMRスペクトルを図1に、125MHz

^{13}C -NMRスペクトルを図2に各々示した。



-169-

-18-

第 1 表

	炭 素 源 (g)		乾燥固体 重量 (g)	共重合体 含有率 (wt%)	共重合組成 (モル%)			[η] (dl/g)	融解温度 ($^{\circ}$ C)	融 解 熱 (cal/g)
	4-ヒドロ キシ酪酸	吉 草 酸			(3HB)	(4HB)	(3HV)			
実施例1	17.5	2.5	7.8	18	32	45	23	3.7	166 87 78	3.1 2.3
2	15.0	5.0	9.6	17	34	30	36	5.7	163 89 81	2.5 3.3
3	10.0	10.0	10.4	24	31	14	55	6.4	162 92	1.6 4.8
4	7.5	12.5	10.5	24	28	5	67	7.1	171 94	1.4 8.1
比較例1	20	0	7.2	19	66	34	0	4.0	166	7.1
2	0	20	12.5	36	10	0	90	4.0	108	13.8

〔 発明の 効果 〕

本発明によれば 3 H B 成分、4 H B 成分および 3 H V 成分を含有する新規のポリエステル共重合体を容易に得ることができる。

さらに本発明で得られた共重合体は、優れた種々の特性を有しているので手術糸および骨折固定用材などの医用材料の原料として極めて好適であり、また徐放性システムへの利用などの多方面への応用が期待される。

* 図面の簡単な説明

図 1 は実施例 1 で得られた共重合体の 500 MHz、 ^1H -NMR スペクトル、図 2 は同じく実施例 1 で得られた共重合体の 125 MHz、 ^{13}C -NMR スペクトルを示す。

出 願 人 三菱化成工業株式会社
代 理 人 弁理士 長谷川 一
ほか 1 名

- 20 -

図 1

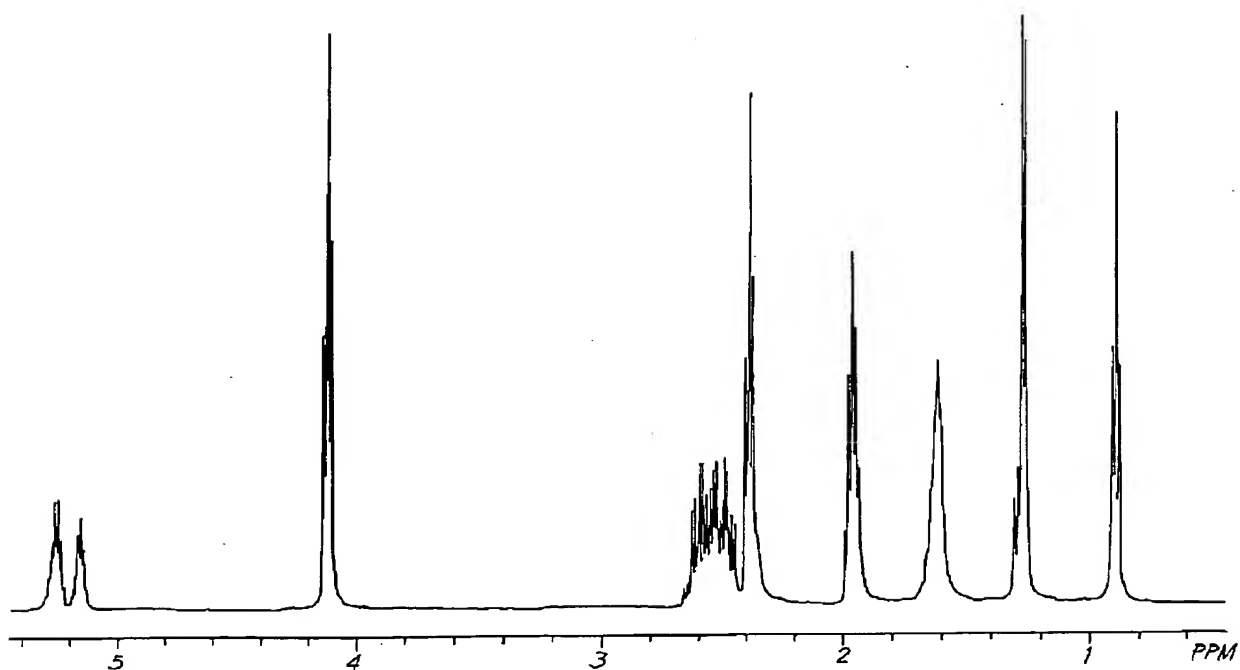
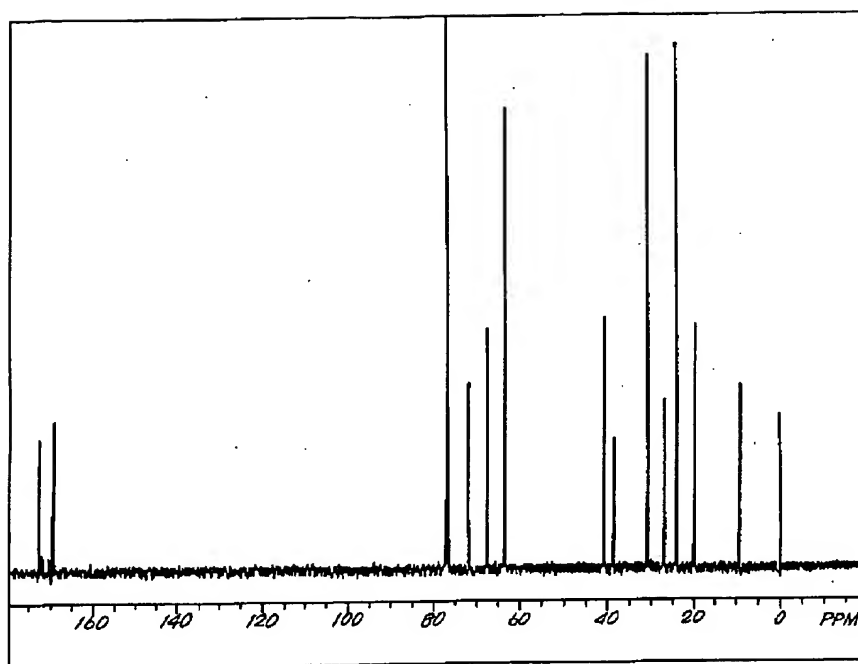


図 2



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**